第43卷 第1期
2000年2月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol.43, No.1
Feb., 2000

文章编号：0454-6296（2000）01-0021-07

HaNPV 在宿主内的复制及其对宿主蛋白质代谢的影响

孙国勋，丁 翠，蔡秀玉
（中国科学院动物研究所，北京 100080）

摘要：对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的中肠、血淋巴及脂肪体进行 SDS-PAGE 蛋白质分析表明：感染早期，HaNPV 对棉铃虫的蛋白质合成有刺激作用，晚期则表现出抑制作用。感染 96 h 和 120 h 脂肪体有较高水平的多角体蛋白合成。电镜观察表明：①HaNPV 感染棉铃虫除病毒在中肠复制后经出芽进入血腔感染脂肪体等组织外，还可能存在病毒粒子直接经中肠进入血腔而感染脂肪体这样的途径；②中肠与血腔之间存在屏障结构；③中肠不仅是一次感染时病毒粒子复制的场所，它完全可能被病毒粒子二次感染。在中肠细胞中没有发现多角体的形成。

关键词：蛋白质；棉铃虫；核型多角体病毒；复制；代谢；一次感染；二次感染
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是棉花等经济作物的主要害虫。因此，研究棉铃虫核型多角体病毒（*Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus, HaNPV）在棉铃虫体内的复制及其对宿主蛋白质代谢的影响，能为 HaNPV 应用于生物防治提供理论依据。

本文选取一次感染组织——中肠，宿主主要代谢器官、同时又是多角体形成的主要场所——脂肪体以及将机体各组织器官有机联系在一起的血淋巴作为观察对象，研究 HaNPV 感染后，宿主蛋白质代谢的变化，结合 HaNPV 在中肠和脂肪体中的复制情况，能较全面地反映 HaNPV 在宿主内复制、侵染途径及对宿主蛋白质代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 虫种

棉铃虫由中国科学院动物研究所昆虫生态室吴坤君研究员提供。均为室内人工饲料饲养传代，饲养温度为 (26±1)℃。

1.2 HaNPV

HaNPV 为本实验室分离提供。从饲养的棉铃虫中挑选虫龄一致的健康个体，用配成一定浓度的 HaNPV 悬液感染幼虫增殖病毒。收集感染病毒而死的幼虫，匀浆，3 层纱布过滤，滤液经差速离心、蔗糖密度梯度离心（45%～60% W/V），纯化的多角体经冷冻干燥，于 -20℃保存备用。

基金项目：“九五”国家攻关项目部分资助
收稿日期：1997-12-29；修订日期：1999-03-15

1.3 棉铃虫中肠、血淋巴及脂肪体的取材

取经口感染 HaNPV 1～5 天的棉铃虫中肠、血淋巴和脂肪体，同时取对照。具体方法是：针刺棉铃虫第一腹足，放出血淋巴，其中加入少许苯基硫脲，防止黑化，－20℃保存备用；解剖棉铃虫，磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗，解剖肠道，去围食膜及内容物，PBS 冲洗，吸干，剪取中肠，称重，选重量相近的 4 条，分别加 50 μL PBS，匀浆，50 μL PBS 冲洗匀浆器 2 次，8 000 r/min离心 30 min，上清液－20℃保存备用。取脂肪体，称重，选重量相近的 4 条，分别加50 μL PBS，匀浆，50 μL PBS 冲洗匀浆器 2 次，8 000 r/min 离心 30 min，上清液－20℃保存备用。

1.4 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 参照 Laemmli 电泳系统进行不连续垂直板电泳[1]，浓缩胶为 4%，pH 6.8，分离胶为 7.5%～17.5%线性梯度，pH8.8。标准蛋白为 Sigma 公司产品。样品及标准蛋白用样品缓冲液溶解，沸水处理 4 min 后加样。稳压 200 V，电泳时间为 4～5 h，考马斯亮蓝染色。中肠和脂肪体匀浆液各取 10 μL、血淋巴取 5 μL 用于电泳。

1.5 病毒经血腔感染棉铃虫

经口感染 HaNPV 后 4 天的棉铃虫，75%的酒精消毒，消毒针刺破腹足，放出血淋巴于高压灭菌的管中，100 μL 血淋巴中加入 4 μL 经过滤菌的苯基硫脲（浓度为 1 mg/mL），防止黑化。选 5 龄初的棉铃虫，75%的酒精消毒，用拉制的毛细管（消毒）吸血淋巴 6 μL，于第 4、5 腹节之间刺入（进针不能过深），将血淋巴吹入虫体内，拔出毛细管，将虫子放入装有人工饲料的指形管中。对照组注射 0.9% NaCl（100 μL 含 4 μL 1 mg/mL 的苯基硫脲）6 μL。

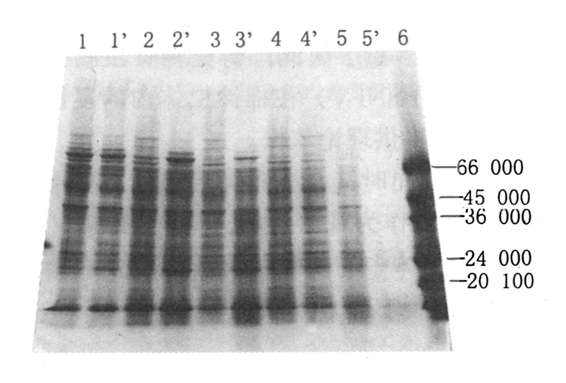


图 1 中肠匀浆液线性梯度胶电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE pattern of midgut proteins of infected and non-infected *H. armigera* larvae at different time course (7.5%～17.5% linear gradient)

1～5 泳道分别为感染 HaNPV 后 120 h、96 h、72 h、48 h 和 24 h（Lanes 1～5：midgut hemogenate at 120 h, 96 h, 72 h, 48 h and 24 h, respectively, after HaNPV inoculation)；1′～5′分别为相应的对照组；6 为标准蛋白（Lanes 1′～5′：normal midgut hemogenate（CK）at the same times as the infected groups; Lane 6：molecular weight markers)

1.6 透射电镜超薄切片的制备

取材中肠、脂肪体同前。将取得的材料放入 2.5%戊二醛 4℃固定 40～41 h，再用 1%锇酸固定 1 h，样品用梯度乙醇（30%，50%，75%，85%，95%，100%）脱水，再用 1，2-环氧丙烷和 Epon812 混合物（1∶1）置干燥器中渗透 36 h，将样品移至塑料胶囊底部，加 Epon812，置干燥器中渗透 48 h，然后放在 60℃的烤箱中固化 48 h。切片后用醋酸铀和柠檬酸铅染色，H-300 型透射电镜观察。

2 结果

2.1 中肠匀浆液电泳图谱

感染 24 h 的电泳图谱，无论是蛋白质的含量，还是蛋白质带的数量，均高于对照组；感

染 48 h 的蛋白含量及带的数量与对照组相仿；感染 72 h 蛋白带数略高于对照组，96 h 及 120 h与各自对照组相比较，蛋白带数基本相同。感染 72 h 后，在高分子量区出现蛋白带的变化，大部分表现为含量降低，但也有少量谱带表现为增高（图 1）。

2.2　血淋巴电泳图谱

感染 24 h 和 48 h 的谱带明显多于各自的对照组，感染 72 h 的谱带较对照组少，感染 96 h和 120 h 的谱带较各自的对照组略少。感染 72 h 后，一些蛋白含量降低，这些变化也主要发生在高分子量区（图 2）。

2.3　脂肪体匀浆液电泳图谱

感染 24 h 蛋白带在数量上高于对照组，感染 48 h 则低于对照组，感染 72 h 以后，除感染 96 h 和 120 h 出现的多角体蛋白带外，感染组与对照组在带数上基本相仿。感染 48 h 后，一些蛋白含量降低，但也有少数谱带表现为含量增加，这些变化也主要发生在高分子量区(图 3)。

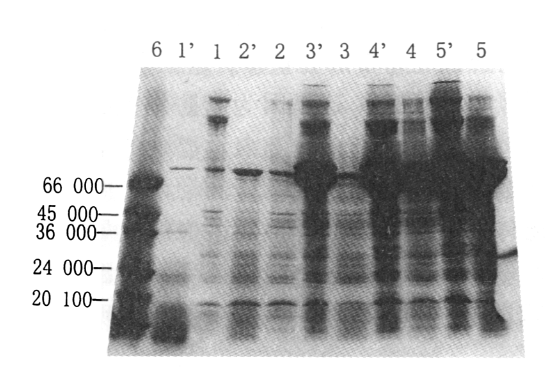


图 2　血淋巴线性梯度胶电泳图谱

Fig.2　SDS-PAGE pattern of hemolymph proteins of infected and non-infected *H. armigera* larvae at different time course (7.5%～17.5% linear gradient)

1～5 泳道分别为感染 HaNPV 后 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h（Lanes 1～5：hemolymph at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h, respectively, after HaNPV inoculation)；1′～5′：分别为相应的对照组；6 为标准蛋白（Lanes 1′～5′：normal hemolymph (CK) at the same times as the infected groups；Lane 6：molecular weight markers)

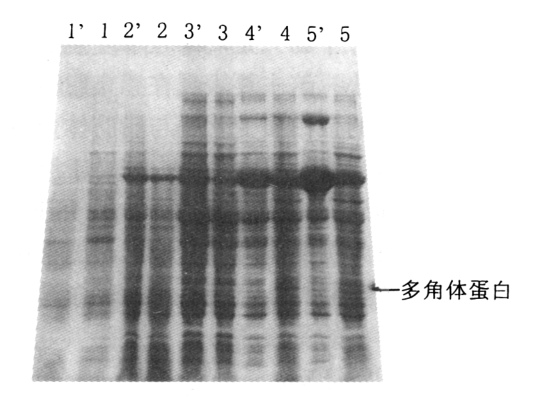


图 3　脂肪体匀浆液线性梯度胶电泳图谱

Fig.3　SDS-PAGE pattern of fat body proteins of infected and non-infected *H. armigera* larvae at different time course (7.5%～17.5% linear gradient)

1～5 泳道分别为感染 HaNPV 后 24 h、48 h、72 h、96 h和 120 h（Lanes 1～5：fat body hemogenate at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h, respectively, after HaNPV inoculation)；1′～5′分别为相应的对照组（Lanes 1′～5′：normal fat body hemogenate (CK) at the same times as the infected groups)

2.4　HaNPV 感染后中肠细胞和脂肪体细胞的变化

经口感染的中肠细胞 24 h 出现核仁增多、增大，直到 72 h 出现病毒粒子复制。血腔注射感染的中肠细胞在 72 h 出现病毒粒子复制。经口感染的脂肪体细胞 48 h 出现核仁增大，72 h 有病毒粒子复制，120 h 细胞质中出现泡状结构。血腔注射感染的脂肪体细胞 48 h 出现病毒粒子复制，96 h 细胞质中出现泡状结构（图版Ⅰ、Ⅱ）。

3 讨论

3.1 HaNPV 感染后不同组织的蛋白质变化

生物对外源物质的侵入，将发生一系列应答反应以抗御其对自身的损伤，这个现象普遍存在于生物界。在三种组织的电泳图谱中，感染 24 h 的蛋白含量均高于对照组，说明棉铃虫幼虫感染 HaNPV 的早期代谢变化是蛋白质合成增加。在感染早期，由于病毒的刺激作用，使宿主产生应答反应，这一时期增加的蛋白质可能主要是用于抗御病毒对自身的损害。前人对此也有相应的观察[2,3]。在中肠组织中，这种刺激反应可能是病毒直接作用的结果，电镜观察到此时中肠细胞出现病理变化。但脂肪体的反应似乎不是病毒直接作用的结果，因为电镜表明此时的脂肪体无明显病理变化。推测此时脂肪体的代谢变化可能是由于病毒侵入中肠后，宿主对此做出相应的反应，通过神经或体液调节而影响脂肪体的代谢活动，以使蛋白合成增加。

一般认为，中肠只是病毒粒子复制的场所，并不形成多角体[4~6]。因此，它受病毒感染的影响相对较小，这主要表现在感染组与其相应的对照组在谱带的数量和含量上变化较小。

血淋巴中的蛋白质变化是与脂肪体蛋白质变化紧密相关的，这是因为脂肪体是昆虫的蛋白质合成场所，血淋巴中的蛋白来自于脂肪体[3,7]。感染 24 h 脂肪体与血淋巴中的蛋白变化是相应的，即感染组较对照组高，但 48 h，感染组脂肪体的蛋白含量低于对照组，而血淋巴则相反，感染组仍高于对照组，这可能是由于脂肪体合成的蛋白质释放进入血淋巴具有滞后效应而出现的现象。各组织器官通过血淋巴有机地联系在一起，这本身也说明血淋巴除主要接受脂肪体释放的蛋白质外，还接受其它组织释放的蛋白质。因此，这种现象的出现，不能排除其它组织的影响。

在脂肪体组织中，感染 72 h 以后，蛋白谱带数量无多大变化，主要是一些蛋白的含量较对照组减少。在感染 96 h 和 120 h，出现了多角体蛋白带，而在中肠和血淋巴中未发现多角体蛋白带，这与脂肪体是多角体形成的主要场所相符合。

三种组织中，在 75 kD 左右有一正常组较感染组明显高的蛋白带，血淋巴和脂肪体尤为显著。我们没有鉴定其性质，估计与棉铃虫成熟有关。

3.2 HaNPV 在宿主内的复制

一般认为，NPV 被宿主食入后，在中肠的碱性环境中，多角体降解，释放出带有囊膜的病毒粒子，病毒粒子的囊膜与中肠细胞上的特异性受体作用，通过直接的膜融合，侵入中肠细胞，病毒粒子经核孔进入核中脱衣，复制出子代病毒粒子，这些病毒粒子以出芽的方式进入血腔并获得囊膜，开始二次感染[5,8~10]。这些病毒粒子通过囊膜 gp64 蛋白与二次感染组织细胞上的特异性受体结合，以细胞内吞作用进入细胞质中，经膜融合，释放出病毒粒子，病毒粒子经核孔进入核中脱衣复制，复制出的病毒粒子获得囊膜，多角体蛋白沉积其上，形成多角体。昆虫在感染后期死亡崩解，释放出的多角体能经口感染健康昆虫[11,12]。

经口感染的棉铃虫幼虫中肠细胞和脂肪体细胞，出现病理变化的时间不同。中肠细胞在感染 24 h 出现了核仁增多、增大和细胞核增大的病理变化；而脂肪体细胞在感染 24 h 未见明显病理变化，在感染 48 h 出现核仁增大的病理变化，但二者均于感染 72 h 出现病毒粒子。这

两种组织的表现似乎相矛盾，推测引起此现象可能有以下三个原因：一是中肠细胞早在感染 72 h 之前就有病毒粒子的复制，由于开始复制时的病毒粒子总数较少，加之通过出芽进入血腔，使细胞中病毒粒子数更少，观察不到病毒粒子；二是由于细胞感染的不同步性，早期没有取到病毒粒子复制部位；三是如 Tanada 等报道的那样，NPV 也与 GV 一样通过细胞间隙直接进入血腔发生感染[13]。Granados 也曾指出，有些进入细胞质中的核衣壳并不进入细胞核中，而是直接移向基底膜，通过出芽进入血腔，直接参与宿主的全身感染[5]。

经口感染的脂肪体细胞在 96 h 见有大量的病毒粒子，有的病毒粒子排列成簇，这种排列的意义还不明了，推测这样的排列可能便于囊膜的获得，或者是易于多角体蛋白对其进行包埋。在感染 120 h，胞浆中出现了大量的空泡，而脂滴和线粒体消失。在此阶段，感病幼虫拒食，虫体代谢及多角体形成所需能量，主要靠体内脂类物质的氧化提供，脂类物质的消耗，在胞浆中形成了大量的内壁光滑的泡状结构，而较小的、形状不规则的囊泡则可能是线粒体结构遭到破坏而形成的。

在注射感染 72 h，中肠细胞中出现病毒发生基质和大量病毒粒子。经口感染的多角体在肠腔中降解释放出病毒粒子侵入中肠细胞，围食膜起到屏障作用[12,14]，血腔注射和经口感染都在 72 h 发现病毒粒子，表明在血腔和中肠之间可能也存在屏障结构。有报道基底膜是这个屏障结构[9,12]。

血腔注射组在中肠细胞中出现病毒粒子，说明中肠不仅是一次感染中的病毒复制场所，释放入血腔的病毒粒子完全有可能重新感染中肠，形成二次感染。无论是注射还是经口感染，中肠细胞中都没有发现多角体的形成。

在多角体形成过程中，出现了大量膜状结构，前人对此有过报道[15,16]，目前还不十分清楚它的功能。它们出现于多角体形成后期，分布于多角体之间，推测可能与多角体膜的形成有关。

参 考 文 献 (References)

[1] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680～685

[2] Shapiro M *et al*. Protein and free amino acid changes in the hemolymph of *Hiliothis zea* larvae during nucleopolyhedrosis. J. Invertebr. Pathol., 1971, 17: 327～332

[3] Johnson D R *et al*. Protein synthesis in fat body of *Trichoplusia ni* during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. J. Invertebr. Pathol., 1972, 19: 219～226

[4] Flipsen J T *et al*. Expression of polyhedrin and P10 in the midgut of AcMNPV～infected *Spodoptera exigua* larvae: An immunoelectron microscopic investigation. J. Invertebr. Pathol., 1993, 61: 17～23

[5] Granados R R *et al*. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. Virology, 1981, 108: 297～308

[6] Harrap K A. Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1970, 42: 311～318

[7] Shigematsu H. Synthesis of blood protein by the fat body in the silkworm *Bombyx mori* L. Nature, 1958, 182: 880～882

[8] Adams J R *et al*. Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses, in vivo and in vitro. Biologie Cellulaire, 1977, 28: 261～268

[9] Keddie B A *et al*. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. Science, 1989, 243: 1 728～1 730

[10] Horton H M *et al*. Saturable attachment sites for polyhedron～derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. J. Virol., 1993, 67: 1 860～1 868

[11] Blissard G W *et al*. Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol., 1990, 35: 127～155

[12] Begon M *et al*. The invasion and replication of a granulosis virus in the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: An electron microscope study. J. Invertebr. Pathol., 1993, 61: 281～295

[13] Tanada Y *et al*. Multiplication of a granulosis virus in larval midgut cells of *Trichoplusia ni* and possible pathways of invasion into the hemocoel. J. Ultrastru. Resear., 1970, 30: 598～600

[14] Washbum J O *et al*. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplasia ni* and *Heliothis virescens*. Virology, 1995, 209: 561～568

[15] Knudson D L *et al*. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: Microscopy study of the sequence of the virus infection. J. Virol., 1976, 17: 254～268

[16] Kelly D C. Baculovirus replication: Electron microscopy of the sequence of infection of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus in *Spodoptera frugiperda* cells. J. Gen. Virol., 1981, 52: 209～219

Replication of HaNPV in host and its effect on metabolism of host proteins

SUN Guo-xun, DING Cui, CAI Xiu-yu

(Institute of Zoology, Chineses Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: SDS-PAGE analyses of the proteins of midgut, hemolymph and fat body indicated that the infection of HaNPV may stimulate initially and then inhibit the synthesis of the host proteins. During all the infected courses, no polyhedrin was found in SDS-PAGE pattern of the midgut and hemolymph. On the contrary, the polyhedrin band appeared in the fat body cells, at both 96 hr and 120 hr after oral inoculation, suggesting high expression of the polyhedrin in the fat body cells. Electron microscopical observation showed that: ①after oral inoculation, the virions as well as the budded virus produced via replication in the midgut could enter into hemocoel and then infect fat body. On the other hand, the midgut could also be infected by the virions from hemocoel injection. In other words, the midgut is not only a primary infection origin, but also a tissue susceptible to secondary infection; ②There was a structural barrier between the midgut and the hemocoel.

Key words: protein; *Helicoverpa armigera*; nuclear polyhedrosis virus (NPV); replication; metabolism; primary infection; secondary infection

图版说明（Explanation of Plates）

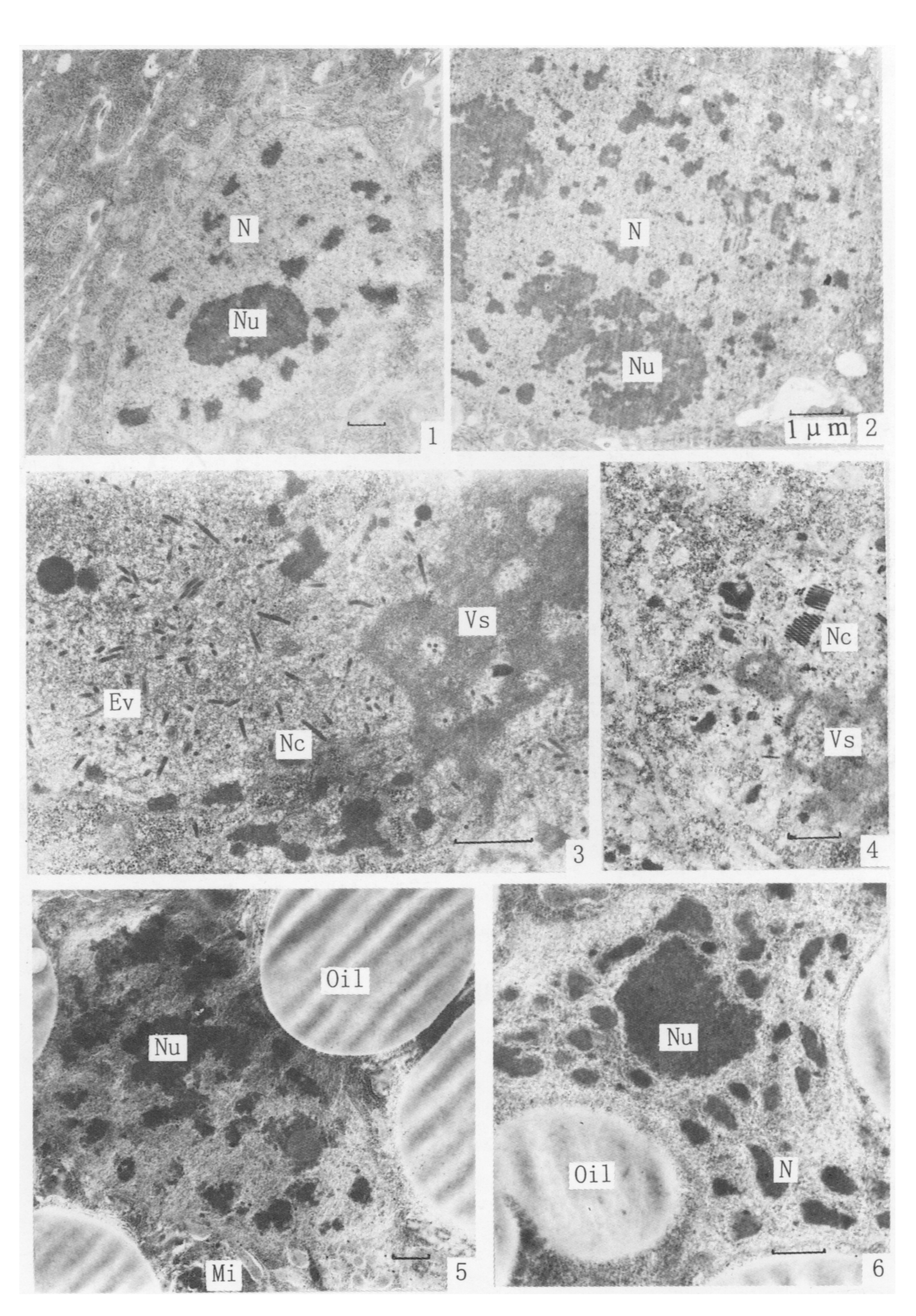
图版Ⅰ（Plate Ⅰ）

1．正常中肠细胞，×7 000（Normal midgut cell，×7 000）；
2．经口感染 HaNPV 24 h 的中肠细胞，×5 000（Midgut cell at 24 hr after oral inoculation with HaNPV，×5 000）；
3．经口感染 HaNPV 72 h 的中肠细胞，×15k（Midgut cell at 72 hr after oral inoculation with HaNPV，×15k）；
4．血腔接种 HaNPV 72 h 的中肠细胞，×10k（Midgut cell at 72 hr after hemocoel injection with HaNPV virions，×10k）；
5．正常脂肪体细胞，×7 000（Normal fat body cell，×7 000）；
6．经口感染 HaNPV 48 h 的脂肪体细胞，×10k（Fat body cell at 48 hr after oral inoculation with HaNPV，×10k）；
标尺：0.5 μm（Bar：0.5 μm）

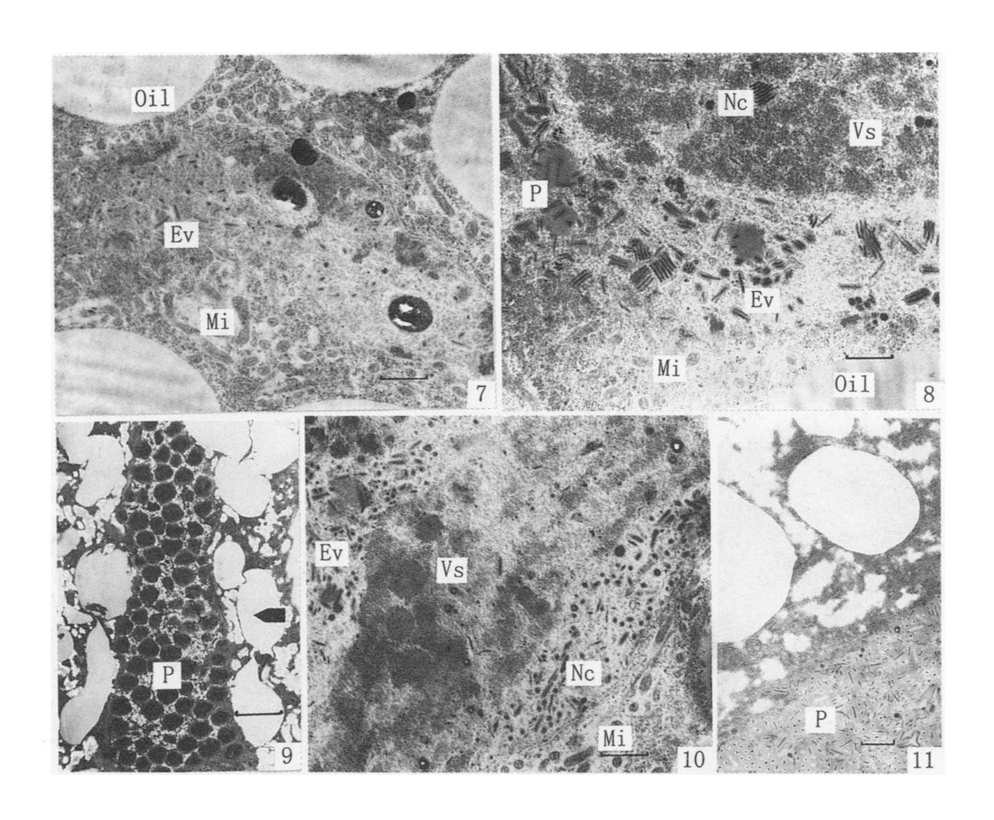
图版Ⅱ（Plate Ⅱ）

7．经口感染 HaNPV 72 h 的脂肪体细胞，×10k（Fat body cell at 72 hr after oral inoculation with HaNPV，×10k）；
8．经口感染 HaNPV 96 h 的脂肪体细胞，×10k（Fat body cell at 96 hr after oral inoculation with HaNPV，×10k）；
9．经口感染 HaNPV 120 h 的脂肪体细胞，×10k（Fat body cell at 120 hr after oral inoculation with HaNPV，×10k）；
10．血腔接种 HaNPV 48 h 的脂肪体细胞，×10k（Fat body cell at 48 hr after hemocoel injection with HaNPV virions，×10k）；
11．血腔接种 HaNPV 96 h 的脂肪体细胞，×7 000（Fat body cell at 96 hr after hemocoel injection with HaNPV virions，×7 000）；

N：细胞核（nucleus）；Nu：核仁（nucleolus）；Vs：病毒发生基质（virogenic stroma）；Nc：核衣壳（nuclear capsid）；Ev：带有囊膜的病毒粒子（enveloped virion）；Oil：脂滴（oil drop）；Mi：线粒体（mitochondria）；P：多角体（polyhedrosis virus）；
标尺：0.5 μm（Bar：0.5 μm）



图版说明见文后(Explanation at the end of the text)



图版说明见文后(Explanation at the end of the text)